

# 苹果 AFLP 分析体系的建立

祝军 王涛 李光晨 赵玉军 张文 周爱琴

( 中国农业大学园艺学院 )

**摘要** 以 12 个苹果砧木基因型为试材, 建立了扩增酶切片段长度多态性(AFLP)分析体系。对其分析过程中DNA 提取、双酶切、连接、预扩增、标记和选择性扩增的效果进行了检测。用 P32M 64 引物构建了供试苹果砧木基因型的 AFLP 指纹图谱。该指纹图谱拥有扩增条带 105 条, 多态性带 67 条(占 63.8%), 条带清晰可辨, 扩增信号强, 无背景干扰。讨论了 AFLP 分析的影响因素。

**关键词** AFLP 分析; DNA 指纹图谱; 苹果

**分类号** S661.1

## Construction of AFLP Analysis System in Apple

Zhu Jun Wang Tao Li Guangchen Zhao Yujun Zhang Wen Zhou Aiqin

(College of Horticulture, CAU)

**Abstract** AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) analysis system was established with 12 apple rootstock genotypes (*Malus*). The results of several reactions during AFLP analysis have been detected such as DNA extraction, double enzymes restriction, adapter-ligation, pre-amplification, labeling and selective amplification. The AFLP fingerprintings of 12 apple rootstock genotypes with primer P32M 64 have been performed, which had 105 clear and strong amplification bands with bright background. The factors which affect AFLP analysis were discussed.

**Key words** AFLP system; DNA fingerprinting; apple rootstocks

AFLP(即扩增酶切片段长度多态性)是一种新的DNA 分子标记技术<sup>[1]</sup>, 其基本原理是选择性扩增带有人工接头的DNA 酶切片段。不同基因型DNA 的酶切位点不同, 从而产生了扩增片段的长度多态性<sup>[2]</sup>。AFLP 分析在分子生物学及动植物育种等领域具有广泛的应用前景<sup>[3,4]</sup>, 尤其对构建动植物DNA 指纹图谱具有重要价值<sup>[5,6]</sup>。目前有关苹果的AFLP 分析未见报道。本研究以苹果为试材, 建立了AFLP 分析体系, 以期达到完善技术和加快推广应用之目的。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验于 1996~ 1998 年在中国农大农业生物技术国家重点实验室和中国农科院品资所农业部作物种质资源与生物技术重点实验室进行。试材为苹果生产上应用的营养繁殖矮化砧木

收稿日期: 1999-09-15

国家自然科学基金 39770523 和教育部博士点基金资助项目

祝军, 现工作单位山东莱阳农学院园艺系, 265200

和实生繁殖乔化砧木<sup>[7]</sup>。包括:八棱海棠(*Malus micranalus*)、山定子(*M. baccata*)、小金海棠(*M. xiaojinensis*)、宁夏8号(*M. prunifolia*)、渥太华3号(*M. baccata* × *M. Sieversii*) × *M. pumila*)、490(*M. pumila*)、9(*M. pumila*)、CG57(*M. pumila*)、CG24(*M. pumila*)、SH9(*M. pumila* × *M. honanensis*)、SH7(*M. pumila* × *M. honanensis*)和S63(*M. honanensis*)。材料取自北京农科院林果所苹果砧木资源圃。于春季取健康正常幼叶,用冰壶带回实验室后,用 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的HCl溶液洗涤和无菌水冲洗。低温干燥后,立即提取基因组DNA。

## 1.2 方法

**1.2.1 模板DNA的制备** 根据Doyle的CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)法<sup>[8]</sup>,从试材鲜叶中提取基因组DNA。经紫外分光光度计(Pharmacia, LKB Ultraspec III)、琼脂糖凝胶电泳和酶切法检测合格后,将DNA稀释至 $200\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ,备用。

**1.2.2 酶切** 总体积为 $25\mu\text{L}$ ,其中包括:DNA  $250\text{ ng}$ , *Pst*I  $2.5\text{ U}$ , *Mse*I  $2.5\text{ U}$ ,  $5\times\text{RL Buffer}$   $2.5\mu\text{L}$ ,  $2.5\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  BSA  $0.5\mu\text{L}$ ,加水至 $25\mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$  保温 $6\text{ h}$ 。

**1.2.3 连接** 酶切后每个DNA样品,加入 $10\mu\text{L}$ 连接混合液,其中包括:*Pst*I接头( $25\text{ pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )  $1.0\mu\text{L}$ , *Mse*I接头( $25\text{ pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )  $1.0\mu\text{L}$ ,  $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  ATP  $1.0\mu\text{L}$ , T<sub>4</sub>DNA连接酶(Pharmacia Biotech) ( $1\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )  $2\mu\text{L}$ ,  $5\times\text{RL Buffer}$   $1.0\mu\text{L}$ ,加水至 $10\mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$  保温 $18\text{ h}$ 。

**1.2.4 预扩增** 取 $5\mu\text{L}$ 连接完成的DNA样品,加入 $15\mu\text{L}$ 如下混合液:*Pst*I引物(POO,  $50\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )  $1.5\mu\text{L}$ , *Mse*I引物(MOO,  $50\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )  $1.5\mu\text{L}$ ,  $10\times\text{PCR Buffer}$   $2.0\mu\text{L}$ , *Taq*酶( $5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )  $0.1\mu\text{L}$ ,  $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dNTP  $1.6\mu\text{L}$ ,加水至 $15.0\mu\text{L}$ 。混匀后,在MJ Research Co. PTC-200型热循环仪上按如下PCR条件扩增: $94^\circ\text{C}$   $30\text{ s}$ ,  $56^\circ\text{C}$   $30\text{ s}$ ,  $72^\circ\text{C}$   $60\text{ s}$ ,共30个循环,预扩增完成后,取 $5\mu\text{L}$ 预扩增产物和 $1\mu\text{L}$  Loading Buffer混匀后,在 $0.8\%$ 琼脂糖凝胶电泳中检测预扩增的效果,取 $5\mu\text{L}$ 预扩增产物加入 $95\mu\text{L}$   $0.1\times\text{TE}$ ,混匀后 $-20^\circ\text{C}$ 保存备用。

**1.2.5 引物标记** 配制标记混合液 $5\mu\text{L}$ (适合10个DNA样品):*Pst*I引物( $50\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )  $1.0\mu\text{L}$ ,  $10\times\text{T}_4$ 多聚核苷酸激酶Buffer  $0.5\mu\text{L}$ ,  $\text{T}_4$ 多聚核苷酸激酶( $9.5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )  $0.1\mu\text{L}$ ,  $10\mu\text{Ci}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的( $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ )ATP  $0.1\mu\text{L}$ ,加水至 $5.0\mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$  保温 $10\text{ h}$ 。

**1.2.6 选择性扩增** 取 $5\mu\text{L}$ 稀释的预扩增混合液,加入 $15\mu\text{L}$ 如下反应液(适合1个DNA样品):*Mse*I引物( $50\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )  $0.6\mu\text{L}$ ,  $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dNTP  $1.6\mu\text{L}$ ,标记的引物混合液 $0.5\mu\text{L}$ , *Taq*酶( $5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )  $0.1\mu\text{L}$ ,  $10\times\text{PCR Buffer}$   $2.0\mu\text{L}$ ,加水至 $20.0\mu\text{L}$ 。混匀后,按如下PCR程序扩增: $94^\circ\text{C}$   $30\text{ s}$ ,  $65^\circ\text{C}$   $30\text{ s}$ (每循环降低 $0.7^\circ\text{C}$ ),  $72^\circ\text{C}$   $60\text{ s}$ ,为12个循环;以后变为: $94^\circ\text{C}$   $30\text{ s}$ ,  $56^\circ\text{C}$   $30\text{ s}$ ,  $72^\circ\text{C}$   $60\text{ s}$ ,共23个循环。扩增后的样品中加入 $20\mu\text{L}$  Loading Buffer,混匀后,经 $95^\circ\text{C}$ 变性 $5\text{ min}$ 立刻转移到冰浴中冷却,待用。

**1.2.7 电泳、成像** 用 $6\%$ 的聚丙烯酰胺胶 $100\text{ mL}$ 加入 $10\%$ 过硫酸铵 $500\mu\text{L}$ 和TEM ED  $100\mu\text{L}$ 制胶。用BioRad 3000电泳系统 $110\text{ W}$ 恒功率电泳 $2.5\text{ h}$ 。干胶后,用MD Storm-820系统压磷屏、扫磷屏、检测、压片、冲片、照相、冲印相片。

## 2 结果与分析

### 2.1 模板DNA的检测

采用改进的CTAB法制备苹果基因组模板DNA电泳图(图1),可见,所提取基因组DNA主带清晰,DNA片段大小在 $30\text{ kb}$ 以上,无降解,无RNA,样品间均匀。紫外分光光度计

测定结果OD260/OD280 比值均在 1.7~ 1.9 范围内, DNA 纯度较高, 新鲜叶片提取产量在 10~ 20  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。这说明采用该法提取基因组DNA 质量好、产量高, 完全能满足 AFLP 分析对 DNA 的要求。

## 2.2 酶切

AFLP 分析酶切为双酶切, 即采用稀有碱基切点酶和常见碱基切点酶同时进行酶切。本试验采用 *Pst*I 为 6 个碱基切点内切酶(图 2), 基因组中切点数量少, 酶切片段较大, 主带消失, 呈梯度模糊状。 *Mse*I 为 4 个碱基切点的内切酶, 基因组中切点数量多, 酶切片段较前者小的多, 一般在 50~ 1 500 bp。同时进行双酶切后, 片段大小类似 *Mse*I, 同样大多在 50~ 1 500 pb 范围内。这表明, 无论是 *Pst*I 或 *Mse*I 单酶切, 还是 *Pst*I 和 *Mse*I 双酶切, 酶切完全, 酶切产物片段大小符合 AFLP 分析对酶切片段的要求。

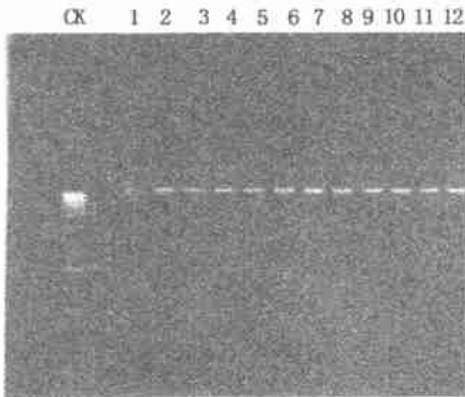


图 1 苹果砧木DNA 电泳( $1\ \mu\text{g}\cdot\text{道}^{-1}$ )

1 宁夏 8 号, 2 小金海淀, 3 山定子,  
4 八棱海棠, 5 渥太华 3 号, 6 490  
7 9, 8 CG57, 9 CG24,  
10 SH9, 11 SH7, 12 S63

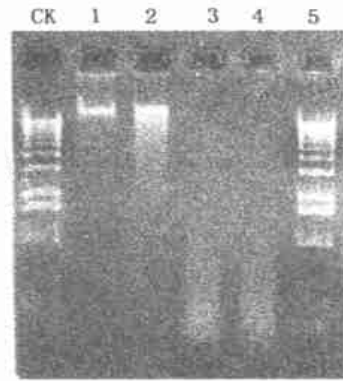


图 2 苹果DNA 单双酶切电泳

( $1\ \mu\text{g}\cdot\text{道}^{-1}$ )

1 叶片DNA, 2 *Pst*I 酶切, 3 *Mse*I 酶切  
4 *Pst*I 和 *Mse*I 双酶切, CK 对照

## 2.3 连接

本研究发现, 连接效率的高低主要取决于 T<sub>4</sub>DNA 连接酶。图 3-A 为连接反应中其他成分不变, T<sub>4</sub>DNA 连接酶半量(1 U/反应)情况下的预扩增结果。与图 3-B T<sub>4</sub>DNA 连接酶全量(2 U/反应)相比, 预扩增片段范围小, 预扩增信号强度弱, 个别样品出现明显异常变化。说明本试验条件下, T<sub>4</sub>DNA 连接酶的用量每个反应应在 1 U 以上, 以 2 U 为宜。

## 2.4 预扩增

供试样品的预扩增结果见图 3-B。本试验采用不带有选择性碱基的引物(POO 和 MOO)作为预扩增的引物。POO 的碱基序列为 5'-GACTGCGTACA TGCA-3', MOO 的碱基序列为 5'-GATGA GTCCTGA GTAA-3'。电泳结果表明, 预扩增片段范围较大, 一般在 50~ 1 500 pb 范围内, 扩增信号较强, 各样品间相对一致。说明, 本试验预扩增效果很好, 为随后进行的选择性扩增提供了理想的模板。同时也表明, 前面基因组DNA 的提取和双酶切以及连接也是符合要求的。

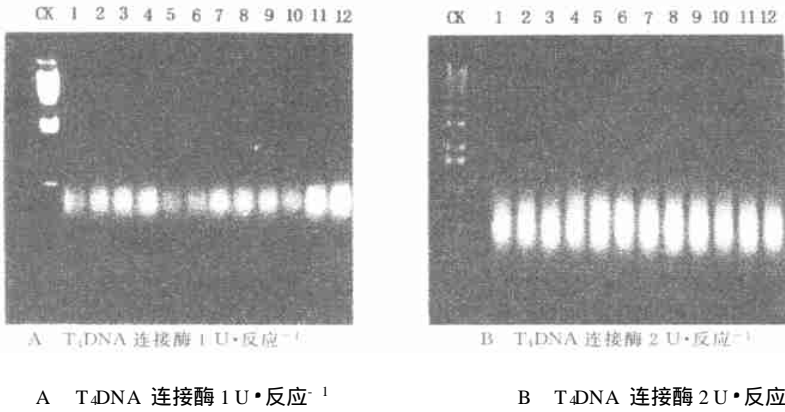


图3 苹果砧木AFLP分析预扩增电泳

2.5 标记

应用P32M 64引物构建的12个苹果砧木基因型的AFLP指纹图谱(图4),其中,样品1~9号采用半量同位素,即0.5μCi·反应⁻¹;10~12号为全量,即1.0μCi·反应⁻¹。图中显示,同位素半量与全量相比,扩增效果无明显差别,但全量时,样品间一致性较好。

2.6 选择性扩增

本试验采用筛选出的P32M 64作为对试材进行选择性扩增的引物,扩增结果见图4。P32的引物序列为5-GACTGCGTACATGCAAAC-3,选择性碱基为5-AAC-3;M64的引物序列为5-GATGAGTTCCTGAGTAA-3,选择性碱基为5-GAC-3。引物选择性扩增的条带实际上是从预扩增产物中筛选出能被P32M 64引物的选择性碱基所识别的DNA片段。该电泳结果表明,在预扩增产物中,能被P32M 64引物识别的DNA片段多达105条,即选择性扩增的总扩增条带数;其中有67条(占63.8%)在各试材基因型间有差异,也就是说,试材基因型间的多态性带为67条,(占63.8%)。可见,AFLP选择性扩增具有很强的检测基因型间遗传变异的能力。从图4还可以看出,该P32M 64指纹图谱扩增条带清晰可辨,扩增信号强度基本一致,扩增片段分布密度比较均匀。说明AFLP指纹图谱的质量是非常高的。我们可以将P32M 64 AFLP指纹图谱分为3个区域: I区为大片段区,分布范围为1000 bp 该区多态性最强; II区为中片段区,分布范围为1000~500 bp,该区多态性中等; III区为小片段区,分布范围为500 pb 以下,该区多态性最低。

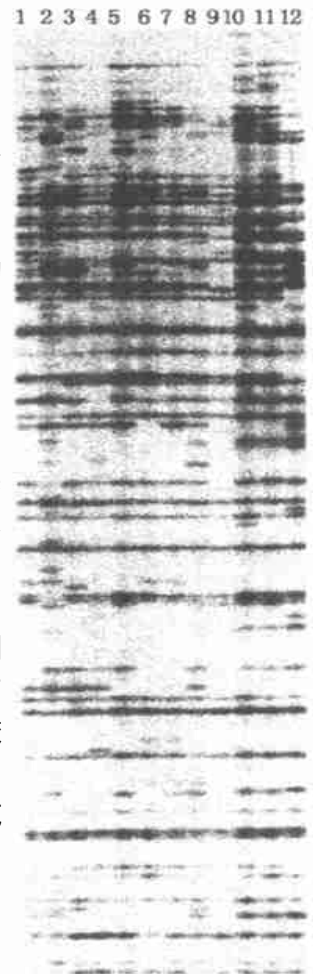


图4 苹果砧木AFLP指纹(P32M 64) 1~9为<sup>32</sup>P 0.5 μCi·反应⁻¹; 10~12为<sup>32</sup>P 1.0 μCi·反应⁻¹

3 讨论

本试验采用P32M 64引物扩增的苹果砧木基因型AFLP指纹

图谱,具有两个明显的特点:一是扩增效率高。该图谱总扩增条带为105条,其中多态性带67条,占63.8%。这意味着该引物对苹果砧木基因组105个位点进行了检测,发现多态性位点67个,多态性比例为63.8%。这是迄今为止报道的苹果基因组DNA指纹分析中扩增效率最高的DNA指纹图谱<sup>[9,10]</sup>。二是图谱质量好。该AFLP指纹图谱,条带清晰,信号强,无背景干扰,为进一步的分子标记研究奠定了基础。

有许多因素影响AFLP分析的效果。DNA提取的质量是AFLP分析的基础。本试验试用过3种提取基因组DNA的方法均能达到AFLP分析的要求,其中,CTAB法简单、快速、实用。双酶切必须完全彻底,否则会出现胶板的上部扩增带多而密,中下部扩增带稀少的现象。酶切之后要马上进行连接,其间不要灭活内切酶,以防酶切片段的自连。预扩增是检验酶切和连接效果的必要手段,预扩增片段小而窄说明酶切不完全或连接效率低,不能作为模板使用。本试验预扩增片段大小范围较宽,约50~1500 bp,预扩增产物量大,且样品间一致性较好,是选择性扩增的理想模板。标记是AFLP分析的关键。本试验用过2家公司的 $\gamma$ -<sup>33</sup>P ATP、3家公司的T<sub>4</sub>多聚核苷酸激酶。其中比较理想的是Amersham公司的 $\gamma$ -<sup>33</sup>P ATP和Pharmacia公司的T<sub>4</sub>多聚核苷酸激酶。本试验中同位素的用量大都采用半量,其效果与全量无明显差别,这样可大大降低成本。标记效率可在电泳结束后立即用Monitor检测,若同位素大都在最前沿,而第一道指示剂后面信号很弱,则表明标记效率太低;若在第一道指示剂处信号很强,该指示剂后面信号很弱,则不是标记的问题而是选择性扩增的问题。选择性扩增的主要影响因素是Taq酶的质量。Taq酶活性强,信号扩增也强,反之则弱。除了上述因素之外,许多因素也会影响AFLP的效果。如丙烯酰胺胶聚合不好,尿素析出太多,电泳时温度过高,甲酰胺质量太差等都会因起DNA扩增带发虚、发散和扭曲。

本研究认为,AFLP分析是一种高效的DNA指纹图谱技术,具有多态性强、灵敏度高、稳定可靠的特点,具有非常广泛的应用前景。

## 参 考 文 献

- 1 Zabeau M, Vos P. Selective restriction fragment amplification, a general method for DNA fingerprintings. European Patent Application. Publication No: 858A 1, 1993
- 2 Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23(21): 4407~ 4414
- 3 贾继增. 分子标记种质资源鉴定和分子标记育种. *中国农业科学*, 1996, 29(4): 1~ 10
- 4 周奕华, 陈正华. 分子标记在植物学中的应用及前景. *武汉植物学研究* 1999, 17(1): 75~ 86
- 5 祝军, 周爱琴, 王涛, 等. 果树分子标记研究进展. *果树生理及分子生物生物学研究* 1999 (1): 23~ 26
- 6 祝军, 李光晨, 王涛, 等. 分子标记及其在果树上的应用. *生命科学研究进展*, 1996, 12: 271~ 275
- 7 杨进. 中国苹果砧木资源. 济南: 山东科学技术出版社, 1990, 19~ 68
- 8 Doyle J L, Doyle J J. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 1990, 12: 13~ 15
- 9 Koller B, Lehmann A, Mcdemott J M, et al. Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theor Appl Genet*, 1993, 85: 901~ 904
- 10 Dunemann F. Genetic Relationships in *Malus* evaluated by RAPD fingerprinting of cultivars and wild species. *Plant Breeding*, 1994, 113: 150~ 159